

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 septembre 2005 (15.09.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/085841 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/487, C12M 1/34

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/050118

(22) Date de dépôt international :
23 février 2005 (23.02.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0450356 26 février 2004 (26.02.2004) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **COM-MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE** [FR/FR];
31-33, rue de la Fédération, F-75752 PARIS 15ème (FR).

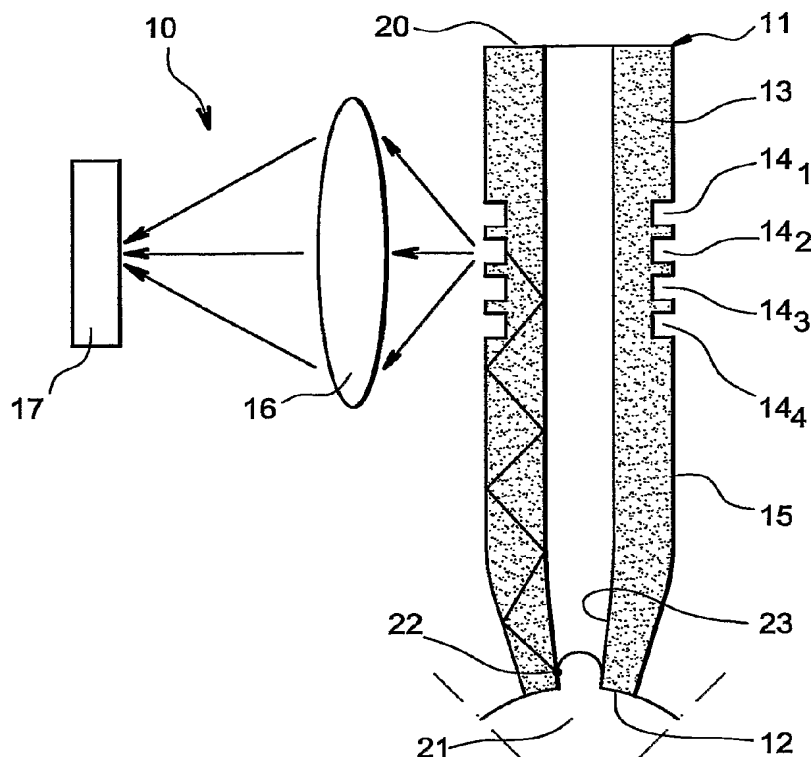
(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **PICOL-LET-D'HAHAN, Nathalie** [FR/FR]; Le Crozat, F-38580 LA FERRIERE (FR). **CHATON, Patrick** [FR/FR]; "Loutre", F-38570 THEYS (FR). **GETIN, Stéphane** [FR/FR]; 41, rue des Eaux Claires, F-38100 GRENOBLE (FR).

(74) Mandataire : **POULIN, Gérard**; Brevatome, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 PARIS (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR CONTROLLING THE POSITIONING OF A BIOLOGICAL ELEMENT ON A SUPPORT

(54) Titre : PROCEDE ET DISPOSITIF DE CONTROLE DU POSITIONNEMENT D'UN ELEMENT BIOLOGIQUE SUR UN SUPPORT



(57) Abstract: The invention relates to a method which can be used to control the positioning of a biological element on an area of a support directly and in real time, whereby the biological element is marked with a light-emitting tracer and the area of the support on which it is to be positioned is located in a layer of material that can trap the light. The inventive method comprises the following steps consisting in: a) allowing the biological element to be positioned on the area of the support; b) measuring the intensity of the light trapped in the aforementioned layer; and c) determining the position of the biological element by comparing the intensity value thus measured to at least one reference value. According to the invention, steps a), b) and c) can be performed successively or simultaneously. The invention also relates to a device which enables said method to be used in order to position one or more biological elements on one or more areas of a support.

[Suite sur la page suivante]

WO 2005/085841 A1



(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) **Abrégé :** L'invention se rapporte à un procédé permettant de contrôler directement et en temps réel le positionnement d'un élément biologique sur une zone d'un support, dans lequel, cet élément biologique étant marqué par un traceur émetteur d'un rayonnement lumineux et la zone du support sur laquelle il doit être positionné étant située dans une couche d'un matériau apte à piéger ce rayonnement lumineux a) on permet à l'élément biologique de se positionner sur la zone du support ; b) on mesure l'intensité du rayonnement lumineux piégé dans ladite couche ; et c) on détermine le positionnement de l'élément biologique en comparant la valeur d'intensité ainsi mesurée à au moins une valeur de référence ; les étapes a), b) et c) pouvant être réalisées successivement ou simultanément. L'invention se rapporte également à un dispositif permettant d'appliquer ce procédé au positionnement d'un ou plusieurs éléments biologiques sur une ou plusieurs zones d'un support.

**PROCEDE ET DISPOSITIF DE CONTROLE DU POSITIONNEMENT
D'UN ELEMENT BIOLOGIQUE SUR UN SUPPORT**

5

DESCRIPTION

DOMAINE TECHNIQUE

L'invention se rapporte à un procédé permettant de contrôler directement et en temps réel le positionnement d'un élément biologique sur une zone
10 d'un support sur laquelle il est destiné à être positionné.

Elle se rapporte également à un dispositif permettant d'appliquer ce procédé au positionnement d'un ou plusieurs éléments biologiques sur une ou
15 plusieurs zones d'un support.

Dans ce qui précède et ce qui suit, on entend par "élément biologique", tout élément naturel ou artificiel dont au 'moins une partie est constituée d'une membrane biologique ou reproduit les
20 caractéristiques fonctionnelles d'une membrane biologique.

Ainsi, il peut s'agir d'une cellule ou d'un organe cellulaire du type vacuole, appareil de golgi, mitochondrie, réticulum endoplasmique, lysosome, ...,
25 d'un fragment de membrane biologique, agrémenté ou non de parties cytosoliques, d'une bicouche lipidique artificielle tel qu'un film de phosphatidylcholine ou de phosphatidylglycérol, dotée d'un ou plusieurs pores protéiques, ou encore d'une membrane biomimétique.

30 Le procédé et le dispositif selon l'invention permettent, en particulier, de vérifier

l'établissement d'un scellement de haute résistance entre un élément biologique et une zone d'un support par la technique du patch-clamp.

Ils sont donc susceptibles de constituer
5 des outils de choix dans tous les domaines où la technique du patch-clamp est elle-même susceptible d'être utilisée.

A titre d'exemples d'applications de cette technique, on peut citer :

10 - la recherche pharmaceutique, notamment pour l'étude des mécanismes responsables au niveau cellulaire des pathologies liées à un dysfonctionnement des canaux ioniques ; l'identification des sites et des modes d'action de médicaments connus pour être
15 efficaces dans le traitement de ces pathologies ; le criblage à moyen ou haut débit de molécules ayant pour cibles des canaux ioniques et pouvant, de ce fait, présenter un intérêt thérapeutique, ou de médicaments candidats dont on souhaite évaluer les effets et/ou la
20 toxicité ; la mise au point d'antidotes contre des poisons ou venins ;

- le domaine médical, notamment pour le diagnostic de pathologies liées à un dysfonctionnement des canaux ioniques ;

25 - l'industrie, en particulier agro-alimentaire, pharmaceutique et cosmétique, notamment pour le contrôle sanitaire des chaînes de fabrication et des produits qui en sont issus ;

- le domaine de l'environnement, notamment
30 pour la détection de polluants ;

- la recherche fondamentale, par exemple pour l'étude des canaux ioniques mécano-sensibles en vue du développement de capteurs "mécaniques" ; la détection de cellules vivantes ou ayant conservé leur
5 intégrité membranaire, ou, au contraire, de cellules mortes ou ayant perdu leur intégrité membranaire ; la mesure d'une modification de capacitance membranaire consécutive à la fusion d'une cellule avec une autre cellule ou une vésicule ; la stimulation de cellules
10 comme des neurones en vue, par exemple, d'étudier, de favoriser, voire d'accélérer, la régénération, la repousse ou la plasticité neuronale ; l'étude de l'activité intracellulaire d'un réseau cellulaire, d'un tissu ou d'une co-culture cellulaire, l'étude de la
15 réponse de cellules A à l'application d'une stimulation électrique à des cellules B ou encore l'étude de la fonction d'un canal ionique par le blocage de l'expression du gène codant cette protéine, suite à l'introduction dans la cellule de molécules telles
20 qu'un ADN anti-sens ou un ARNsi ("small interference").

ÉTAT DE LA TECHNIQUE ANTÉRIEURE

La technique du patch-clamp, mise au point par NEHER et SAKMANN en 1981, reste à ce jour la technique la plus performante pour contrôler les
25 différences de potentiel électrique transmembranaire au niveau d'un fragment de membrane plasmique ou d'une cellule entière et, partant, pour accéder directement aux flux ioniques circulants dans les canaux ioniques de ce fragment de membrane ou de cette cellule.

30 Telle qu'initialement conçue, elle consiste à appliquer l'extrémité inférieure d'une micropipette

en verre sur la membrane plasmique d'une cellule et à établir, par une aspiration buccale au niveau de l'extrémité supérieure de la micropipette, un scellement de haute résistance, de l'ordre de 1 à 10
5 gigaoohms (d'où le fait qu'il est usuellement désigné par le terme anglo-saxon "gigaseal"), entre l'extrémité inférieure de la micropipette et le fragment de membrane au contact duquel elle se trouve (configuration "cellule-attachée").

10 L'aspiration peut être poursuivie jusqu'à obtenir l'ouverture de ce fragment de membrane (configuration "cellule-entière"). Ce dernier peut également être isolé du reste de la cellule par excision mécanique : on parle dans ce cas de "patch
15 excisé".

Il est alors possible, en appliquant une tension électrique constante au fragment de membrane ou à la cellule et en enregistrant les variations de cette tension, de mesurer l'activité électrique résultant
20 d'un changement d'état (ouverture ou fermeture) des canaux ioniques situés sur l'intégralité de la membrane cellulaire (en configuration "cellule-entière") ou sur le seul fragment de membrane ou même sur un seul canal ionique (en configuration "cellule-attachée" ou "patch
25 excisé").

Afin de faciliter la mise en œuvre de cette technique et de la rendre plus performante, un certain nombre d'équipes s'est attaché au cours de ces dernières années à développer des dispositifs, et
30 notamment des dispositifs miniaturisés de type biopuces, destinés à mesurer les échanges ioniques

transmembranaires de plusieurs cellules en parallèle selon le principe du patch-clamp.

Ces dispositifs comprennent généralement un substrat plan, microstructuré, c'est-à-dire muni de puits micrométriques, sur lequel sont déposées les cellules, ainsi qu'un ou plusieurs canaux permettant, par actionnement d'une pompe, de créer une aspiration à la base de ces puits et de réaliser ainsi un gigaseal entre le substrat et un fragment de la membrane plasmique de ces cellules.

De tels dispositifs sont, par exemple, décrits dans WO 01/25769 [1] et dans WO 01/59447 [2].

Que la technique du patch-clamp soit mise en œuvre de façon conventionnelle, c'est-à-dire au moyen d'une micropipette en verre, ou sur une biopuce, la fiabilité des résultats obtenus dépend principalement de la réussite du gigaseal, celle-ci conditionnant, en effet, la stabilité de la liaison entre le support et la membrane cellulaire, l'isolation électrique du fragment membranaire, la bonne application d'un potentiel électrique à ce fragment et la validité de la mesure du courant électrique résultant. Or, le gigaseal est relativement difficile à obtenir : ainsi, le taux de réussite est d'environ 40 à 50% en patch-clamp conventionnel, et d'environ 20% pour les biopuces.

A l'heure actuelle, le suivi et le contrôle de l'établissement d'un gigaseal se fait par des mesures de résistance électrique puisque l'invagination d'un fragment de membrane cellulaire dans l'extrémité d'une micropipette ou à la base d'un micropuits, puis

le scellement de ce fragment sur cette extrémité ou cette base ont pour effet de créer une résistance au passage d'un courant électrique.

Ces mesures présentent l'inconvénient
5 majeur de ne pas permettre un contrôle direct de l'établissement du gigaseal car elles nécessitent d'appliquer des pulses de tension successifs et de calculer les variations de résistance, sachant que l'augmentation de la résistance peut être rapide ou
10 lente, selon la loi du tout-ou-rien ou être très progressive. De plus, dans le cas d'une biopuce, elles nécessitent de procéder à un enregistrement en parallèle des variations de résistance dans tous les puits avant d'identifier ceux dans lesquels un gigaseal
15 s'est établi, puis de revenir aux puits "positifs" pour ensuite leur appliquer les protocoles d'activation des canaux ioniques.

Les Inventeurs se sont, donc, fixé pour but, de fournir un procédé qui permette de contrôler
20 directement et en temps réel le positionnement d'un élément biologique sur une zone d'un support sur laquelle il est destiné à être positionné et, en particulier, le scellement de cet élément biologique sur cette zone, et ce, aussi bien dans le cas où le
25 support est cylindrique à l'instar des micropipettes utilisées dans la technique conventionnelle du patch-clamp que dans celui où il est plan comme les supports entrant dans la constitution des biopuces.

Ils se sont également fixé pour but de
30 fournir un dispositif permettant d'appliquer ce procédé

au positionnement d'un ou plusieurs éléments biologiques sur une ou plusieurs zones d'un support.

EXPOSÉ DE L'INVENTION

Ce but, et d'autres encore, sont atteints
5 par un procédé de contrôle du positionnement d'un élément biologique sur une zone d'un support, dans lequel, cet élément biologique étant marqué par un traceur émetteur d'un rayonnement lumineux et la zone du support sur laquelle il doit être positionné étant
10 située dans une couche d'un matériau apte à piéger ce rayonnement lumineux :

a) on permet à l'élément biologique de se positionner sur la zone du support ;

b) on mesure l'intensité du rayonnement
15 lumineux piégé dans ladite couche ; et

c) on détermine le positionnement de l'élément biologique en comparant la valeur d'intensité ainsi mesurée à au moins une valeur de référence ;
les étapes a), b) et c) pouvant être réalisées
20 successivement ou simultanément.

Ainsi, le procédé selon l'invention consiste en un contrôle optique du positionnement de l'élément biologique par rapport à la zone du support sur laquelle il est destiné à être positionné, et en
25 particulier en un suivi dans le temps de ce positionnement.

Ce contrôle optique est basé sur la propriété que présente un rayonnement émis par une source lumineuse à se comporter différemment dans une
30 couche d'un matériau plus réfringent que le milieu dans

lequel il est émis selon la distance qui sépare ladite source lumineuse de la surface de cette couche.

En effet, comme montré expérimentalement par M. Lieberherr et al. dans *Surface Science*, vol. 189/190, 954-959, 1987 [31], et illustré sur la figure 1 jointe en annexe, lorsqu'une source lumineuse S telle qu'un fluorophore, est suffisamment proche de la surface d'une couche C d'un matériau, par exemple à quelques nanomètres de cette surface, l'angle de réfraction θ des rayons de cette source dans la couche C se situe au-delà de l'angle critique θ_c . Il est, par ailleurs, bien connu que les rayons lumineux possédant un tel angle se propagent dans la couche C en réflexion totale.

Ainsi, l'intensité lumineuse piégée dans le matériau est une fonction de la distance qui sépare la source lumineuse de la surface de la couche et sa mesure permet d'apprécier cette distance.

Conformément à l'invention, l'élément biologique est, de préférence, marqué par un traceur fluorescent bien que d'autres types de traceurs puissent être utilisés comme des traceurs bioluminescents ou chimioluminescents dès lors qu'ils peuvent être fixés sur ou exprimés à la surface d'un élément biologique.

Ce traceur fluorescent peut se présenter sous des formes très diverses.

Ainsi, par exemple, il peut notamment s'agir d'un fluorophore organique du type fluorescéine et ses dérivés (isothiocyanate de fluorescéine par exemple), vert Orégon, rhodamine et ses dérivés

(isothiocyanate de tétraméthylrhodamine par exemple), rouge Texas, Bodipy, cyanine et ses dérivés (Cy 3.5 par exemple), que l'on couple chimiquement à une ou plusieurs protéines membranaires de l'élément
5 biologique.

Il peut également s'agir d'un anticorps marqué par l'un de ces fluorophores, qui est dirigé contre une protéine membranaire de l'élément biologique et que l'on fixe sur cet élément par une réaction
10 antigène-anticorps, ou d'une protéine membranaire fluorescente comme la protéine verte fluorescente (GFP), extraite de la méduse *Aequorea victoria* et ses dérivés de couleurs variées (cyan, jaune et bleu), qui est exprimée par l'élément biologique après
15 transfection de ce dernier avec l'ADNc codant cette protéine.

Tous ces traceurs fluorescents et leurs protocoles d'utilisation sont bien connus de l'homme du métier et sont référencés dans des catalogues
20 commerciaux tels que ceux des sociétés Molecular Probes et Clontech.

L'élément biologique peut également être marqué par un traceur fluorescent minéral tel qu'un "quantum dot", comme décrit par B. Dubertret dans *M/S*
25 n°5, vol. 19, 532-534, 2003 [4].

Comme précédemment indiqué, la zone du support sur laquelle l'élément biologique doit être positionné est située dans une couche d'un matériau apte à piéger le rayonnement lumineux émis par
30 l'élément biologique, plus simplement désignée ci-après "la couche".

Dans le cadre de la présente invention, on entend par "matériau apte à piéger le rayonnement lumineux émis par l'élément biologique", tout matériau présentant la double propriété d'être transparent au type de rayonnement lumineux émis par l'élément biologique de manière à en permettre la propagation, et de présenter un indice de réfraction supérieur à l'indice de réfraction des milieux situés de part et d'autre du milieu de propagation au moment où l'on souhaite positionner l'élément biologique sur la zone du support, et en particulier du milieu dans lequel se trouve l'élément biologique.

Il est souhaitable que ce matériau soit, de plus, biocompatible et qu'il n'émette pas lui-même un rayonnement lumineux, en tout cas de même longueur d'onde que le rayonnement lumineux émis par l'élément biologique afin de ne pas interférer avec ce dernier.

Ainsi, par exemple, si l'élément biologique est marqué par un traceur émetteur d'une lumière visible comme un traceur fluorescent, et si le milieu dans lequel il se trouve est un milieu physiologique (milieu aqueux salin d'indice de réfraction $\approx 1,33$ pour la lumière visible), le matériau formant la couche peut être un verre organique ou minéral, notamment du verre, de la silice, du nitrure de silicium (Si_3N_4), du dioxyde de titane (TiO_2), du dioxyde de hafnium (HfO_2), de l'alumine (Al_2O_3), de la silice chargée en ions potassium ou argent, par exemple par échange d'ions, ou l'un des très nombreux polymères de synthèse proposés sur le marché qui présentent des pourcentages élevés de transmission de la lumière visible (en pratique, de

l'ordre de 90% ou supérieurs) conjugués à des indices de réfraction d'1,5 ou plus.

A titre d'exemples de tels polymères, on peut citer les polydiméthylsiloxanes, les poly-
5 méthacrylates de méthyle, plus connus sous le nom de plexiglas® et d'altuglas®, les polycarbonates de haute fluidité tels que ceux commercialisés par les sociétés Bayer, Dow ou GE Plastics ou encore les copolymères à
10 base d'oléfinés cycliques tels que ceux commercialisés par les sociétés Ticona et Mitsui Chemical Industries.

Conformément à l'invention, l'étape a) du procédé peut consister à laisser cet élément biologique se mettre en place sur la zone du support, par exemple
par simple sédimentation, ou, au contraire, à agir sur
15 cet élément de manière à faciliter, accélérer ou optimiser son positionnement, par exemple par application d'un champ de pression, d'un champ électrique, ou analogue.

A l'étape b), la mesure de l'intensité du rayonnement lumineux piégé dans la couche implique que
20 ce rayonnement soit préalablement extrait de cette couche, c'est-à-dire qu'il soit amené à ressortir de cette couche après s'y être propagé par réflexion interne.

25 Conformément à l'invention, cette extraction peut être réalisée par des moyens que comporte de façon permanente le support ou dont on munit provisoirement celui-ci avant de procéder à la mesure de l'intensité du rayonnement lumineux piégé, ou
30 même avant de permettre à l'élément biologique de se

positionner dans le cas où les étapes a) et b) ne sont pas réalisées simultanément.

Aussi, le procédé selon l'invention peut-il comprendre, préalablement à l'étape a) ou entre les
5 étapes a) et b), une étape consistant à munir le support de moyens d'extraction du rayonnement lumineux piégé dans la couche. Ces moyens d'extraction sont décrits plus loin.

Par ailleurs, à l'étape b), la mesure du
10 rayonnement lumineux piégé dans la couche peut être optimisée par la présence de moyens propres à collecter le rayonnement lumineux extrait de cette couche avant que son intensité ne soit mesurée, du type lentille(s) convergente(s), miroir(s), éventuellement associé(s) à
15 une ou plusieurs lentilles, matrice de microlentilles et/ou de micromiroirs, ou analogues.

Aussi, le procédé selon l'invention peut-il également comprendre, préalablement à l'étape a) ou entre les étapes a) et b), une étape consistant à
20 placer, en regard de la couche, des moyens pour collecter le rayonnement lumineux extrait de cette couche si de tels moyens ne sont pas initialement présents.

L'étape b) du procédé peut être réalisée
25 par tout système permettant de détecter et de quantifier un rayonnement lumineux comme, par exemple, un capteur ponctuel du type tube photomultiplicateur ou photodiode, ou un capteur d'images comme un tube vidéo, une caméra CCD, une caméra CMOS ou une caméra de
30 photodiodes.

Quant à l'étape c), elle peut notamment consister à comparer la valeur d'intensité mesurée à une courbe étalon exprimant la variation de l'intensité lumineuse piégée dans la couche en fonction de la position de l'élément biologique par rapport à la zone du support sur laquelle il doit être positionné, préalablement établie dans des conditions expérimentales identiques.

Conformément à l'invention, le positionnement de l'élément biologique sur la zone du support comprend, de préférence, le scellement de cet élément sur cette zone.

Dans le cas où la zone du support sur laquelle l'élément biologique doit être scellé est constituée par les bords d'une ouverture traversante ménagée dans ce support, alors l'étape a) du procédé selon l'invention comprend, de préférence, la création d'une dépression dans cette ouverture propre à permettre à l'élément biologique d'y pénétrer partiellement et de se sceller sur ses bords.

Dans un tel cas, les étapes a), b) et c) sont, de préférence, réalisées simultanément de manière à contrôler la qualité du scellement au fur et à mesure que celui-ci s'établit.

Comme précédemment indiqué, l'élément biologique peut être tout élément naturel ou artificiel dont au moins une partie est constituée d'une membrane biologique ou reproduit les caractéristiques fonctionnelles d'une membrane biologique, comme une cellule ou un organite cellulaire du type vacuole, appareil de golgi, mitochondrie, réticulum

endoplasmique, lysosome, ..., un fragment de membrane biologique, agrémenté ou non de parties cytosoliques, une bicouche lipidique artificielle tel qu'un film de phosphatidylcholine ou de phosphatidylglycérol, dotée
5 d'un ou plusieurs pores protéiques, ou encore une membrane biomimétique.

De préférence, l'élément biologique est une cellule.

L'invention a également pour objet un
10 dispositif de contrôle du positionnement d'au moins un élément biologique sur au moins une zone d'un support, qui comprend :

- un support comprenant une couche d'un matériau apte à piéger un rayonnement lumineux prévu
15 pour être émis par ledit élément biologique, et des moyens pour extraire le rayonnement lumineux piégé dans cette couche, ladite zone du support étant située dans ladite couche ; et

- des moyens pour mesurer l'intensité du
20 rayonnement lumineux extrait de ladite couche.

Selon un premier mode de réalisation préféré du dispositif, le support est un tube ouvert à ses deux extrémités et la zone sur laquelle l'élément biologique doit être positionné est l'une des deux
25 ouvertures de ce tube.

Dans ce cas, le support est, de préférence, une micropipette, et notamment une micropipette adaptée à la mise en œuvre de la technique du patch-clamp.

Selon un autre mode de réalisation préféré
30 du dispositif, le support est un support plan, c'est-à-dire de forme générale plane, et la zone sur laquelle

l'élément biologique doit être positionné est une ouverture que comporte ce support, laquelle peut consister en une dépression, plus ou moins prononcée, creusée dans l'une des faces du support ou être une
5 ouverture traversante, c'est-à-dire s'étendant d'une face à l'autre du support.

Dans ce dernier cas, le support est, de préférence, un support adapté à la mise en œuvre de la technique du patch-clamp.

10 Comme précédemment indiqué, la couche de matériau apte à piéger le rayonnement lumineux, plus simplement désignée ci-après "la couche", peut notamment être en un verre organique ou minéral, en silice, en nitrure de silicium, en dioxyde de titane,
15 en dioxyde de hafnium, en alumine, en silice chargée en ions potassium ou argent, ou en un polymère de synthèse.

Cette couche peut, par ailleurs, s'étendre sur toute l'épaisseur du support ou, au contraire, n'en constituer qu'une partie, pour autant que le ou les
20 autres matériaux constituant le support qui sont situés à son contact présentent un indice de réfraction inférieur à celui du matériau qui la forme. En tout état de cause, elle présente une épaisseur d'au moins
25 200 nm.

Conformément à l'invention, les moyens pour extraire le rayonnement lumineux piégé dans la couche, comprennent toute configuration du support ou tout élément associé à ce support qui permet d'interrompre
30 la propagation du rayonnement lumineux dans cette couche et de l'en faire ressortir.

Ainsi, ces moyens d'extraction peuvent notamment consister en un relief ou un creux ou une série de reliefs et de creux ménagés dans l'une des faces de la couche, ou en une pièce qui est disposée sur l'une des faces de la couche et qui forme sur cette face un relief ou une série de reliefs et de creux, cette pièce pouvant être amovible ou solidaire de ladite couche.

Ils peuvent également consister en un matériau qui est déposé sur l'une des faces de la couche, en un ou plusieurs points de cette face, ce matériau pouvant se présenter sous forme d'un liquide, d'un gel ou d'un solide.

Ils peuvent encore consister en une interruption de la couche par un matériau opaque au rayonnement lumineux.

Dans le cas où le support est un support plan, les moyens d'extraction s'étendent, de préférence, tout autour de la zone de ce support sur laquelle l'élément biologique doit être positionné.

De préférence, le dispositif selon l'invention comprend de plus des moyens de collecte du rayonnement lumineux extrait de la couche, du type lentille(s) convergente(s), miroir(s), éventuellement associé(s) à une ou plusieurs lentilles, matrice de microlentilles et/ou de micromiroirs, ou analogues.

Comme précédemment indiqué, les moyens de mesure peuvent comprendre tout système permettant de détecter et de quantifier un rayonnement lumineux comme, par exemple, un tube photomultiplicateur, une

photodiode, un tube vidéo, une caméra CCD, une caméra CMOS ou une caméra de photodiodes.

Le dispositif selon l'invention peut encore comprendre des moyens d'excitation d'un ou plusieurs
5 fluorophores dans le cas où le rayonnement lumineux prévu pour être émis par l'élément biologique est un rayonnement fluorescent.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré du dispositif selon
10 l'invention, le support est un support plan qui comprend une pluralité de zones pour le positionnement d'une pluralité d'éléments biologiques, auquel cas :

- la couche de matériau apte à piéger le rayonnement lumineux est divisée en autant de parties
15 que le support comprend de zones ;

- chaque zone du support est située dans l'une de ces parties ;

- ces parties sont séparées les unes des autres par des moyens propres à empêcher le rayonnement
20 lumineux de se propager d'une partie à l'autre ; et

- pour chaque partie de ladite couche, le support comprend des moyens pour extraire le rayonnement lumineux piégé dans cette partie, tandis que le dispositif comprend des moyens pour collecter le
25 rayonnement lumineux extrait de cette partie et des moyens pour mesurer l'intensité du rayonnement lumineux collecté par lesdits moyens de collecte.

Dans ce mode de réalisation préféré, la couche apte à piéger le rayonnement lumineux est, de
30 préférence, supportée par une couche d'un matériau opaque à ce rayonnement lumineux et les parties de la

couche apte à piéger le rayonnement lumineux sont séparées les unes des autres par des saillies de la couche opaque au rayonnement lumineux qui s'étendent dans l'épaisseur de la couche apte à piéger le rayonnement lumineux.

Le dispositif selon l'invention est susceptible d'être intégré dans un système d'analyse plus complexe, notamment dans un système permettant de mesurer conjointement l'activité électrique d'un ou plusieurs éléments biologiques.

En particulier, il peut être associé à :

- des électrodes reliées à un circuit d'alimentation électrique et de mesure d'une grandeur électrique et propres à permettre l'application aux éléments biologiques d'une tension électrique et l'enregistrement des variations de cette tension consécutives à un changement d'état (ouverture ou fermeture) des canaux ioniques de ces éléments biologiques ;

- des capillaires, éventuellement reliés à un système de distribution de liquides et/ou à un système d'aspiration de liquides et propres à permettre l'apport de substances au niveau des zones de positionnement des éléments biologiques ou, au contraire, l'élimination de telles substances, ou encore le changement de composition des milieux d'étude (purge).

L'invention a encore pour objet l'application d'un procédé tel que précédemment défini, ou d'un dispositif tel que précédemment défini, au contrôle de l'établissement d'un scellement de haute

résistance entre au moins un élément biologique et au moins une zone d'un support par la technique du patch-clamp.

5 L'invention sera mieux comprise à la lecture du complément de description qui suit, qui se rapporte à différents modes de réalisation d'un dispositif conforme à l'invention et qui se réfère aux dessins annexés.

10 Bien entendu, ce complément de description est donné uniquement à titre d'illustration de l'invention.

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

15 La figure 1, déjà décrite, illustre le comportement des rayons émis par une source lumineuse telle qu'un fluorophore, lorsque cette source est suffisamment proche de la surface d'une couche d'un matériau plus réfringent que le milieu dans lequel elle se trouve.

20 La figure 2 est une représentation schématique en coupe d'un premier mode de réalisation d'un dispositif selon l'invention conçu pour permettre un contrôle du scellement d'un élément biologique sur l'extrémité d'une micropipette par la technique conventionnelle du patch-clamp.

25 Les figures 3 à 6 sont des représentations schématiques partielles en coupe de la micropipette montrée sur la figure 2 qui illustrent cinq variantes de réalisation des moyens d'extraction d'un rayonnement lumineux que comporte cette micropipette.

30 La figure 7 est une représentation schématique en perspective d'un deuxième mode de

réalisation d'un dispositif selon l'invention conçu pour permettre un contrôle simultané du scellement de plusieurs éléments biologiques sur des ouvertures d'un support plan par la technique du patch-clamp.

5 La figure 8A est une représentation schématique partielle du dispositif montré sur la figure 7, vu en coupe selon la ligne VIII-VIII.

10 Les figures 8B à 8D sont des représentations schématiques partielles du dispositif montré sur la figure 7, vu en coupe selon la ligne VIII-VIII, qui illustrent trois variantes de réalisation des moyens d'extraction d'un rayonnement lumineux que comporte le support de ce dispositif.

15 Sur les figures 2 à 8D, les éléments identiques ont été affectés des mêmes références.

EXPOSÉ DÉTAILLÉ DE MODES DE RÉALISATION PARTICULIERS

20 On se réfère tout d'abord à la figure 2 qui représente schématiquement en coupe un premier mode de réalisation d'un dispositif 10 conforme à l'invention qui est conçu pour permettre le contrôle du scellement d'un élément biologique par la technique conventionnelle du patch-clamp, c'est-à-dire au moyen d'une micropipette.

25 Aussi, dans ce mode de réalisation, le support comportant une zone sur laquelle doit être positionné l'élément biologique est une micropipette, référencée 11 sur la figure 2.

30 Comme les micropipettes conventionnelles de patch-clamp, la micropipette 11 se présente sous la forme d'un tube rigide, ouvert à ses deux extrémités, qui est limité par une paroi 13 d'épaisseur

sensiblement constante, et dont l'une des deux parties terminales va en se rétrécissant.

La zone sur laquelle doit être positionné l'élément biologique est constituée par l'extrémité de la micropipette qui présente la section la plus faible, à savoir l'extrémité référencée 12 sur la figure 2. Cette extrémité représente, en condition d'utilisation, l'extrémité inférieure de la micropipette 11. Elle sera donc appelée, dans ce qui suit, extrémité inférieure, tandis que l'extrémité 20, qui lui est opposée, sera appelée extrémité supérieure.

Comme les micropipettes conventionnelles de patch-clamp, la paroi 13 de la micropipette 11 peut être en verre, auquel cas cette paroi est apte à piéger tout rayonnement dont la longueur d'onde se situe dans le spectre de la lumière visible, et notamment les rayonnements fluorescents. Elle peut également être en un tout autre matériau présentant comme le verre, à la fois une rigidité, une transparence pour la lumière visible et une réfringence plus élevée que les deux types de milieux au contact desquels cette paroi est destinée à être en contact en condition d'utilisation, à savoir l'air et des solutions physiologiques. Ainsi, elle peut notamment être en un polymère transparent du type polyméthacrylate de méthyle ou polycarbonate.

La micropipette 11 comporte, à sa partie médiane, des moyens permettant d'extraire un rayonnement lumineux piégé dans la paroi 13 en condition d'utilisation.

Dans le mode de réalisation illustré sur la figure 2, ces moyens d'extraction consistent en une

série de quatre rainures annulaires, respectivement 14₁, 14₂, 14₃ et 14₄, séparées par trois nervures, qui sont de forme et de dimensions identiques les unes aux autres et qui sont ménagées dans la face externe 15 de la paroi 13. A titre d'exemple, ces rainures peuvent présenter une profondeur de quelques angströms à quelques microns et s'étendre sur la paroi 13 sur une hauteur totale de quelques microns à quelques millimètres.

Le dispositif 10 comprend aussi des moyens 16 pour collecter le rayonnement lumineux extrait de la paroi 13 de la micropipette 11 en condition d'utilisation. Dans le mode de réalisation illustré sur la figure 2, ces moyens de collecte sont constitués par une lentille convergente qui est disposée en regard d'une portion de la face externe 15 de la paroi 13 de la micropipette 11 dans laquelle se trouvent les rainures 14₁ à 14₄, mais il pourrait tout autant s'agir d'un miroir, d'un ensemble de lentilles et/ou de miroirs comme une matrice de microlentilles et/ou de micromiroirs.

Le dispositif 10 comprend encore des moyens 17 pour mesurer l'intensité d'un rayonnement lumineux collecté par les moyens de collecte 16 en condition d'utilisation, qui sont disposés en regard des moyens de collecte. Ces moyens de mesure peuvent notamment comprendre un capteur ponctuel du type tube photomultiplicateur ou photodiode, ou un capteur d'images comme un tube vidéo, une caméra CCD, une caméra CMOS ou une caméra de photodiodes.

L'utilisation du dispositif 10 pour le contrôle du scellement d'un élément biologique sur l'extrémité 12 de la micropipette 11 est extrêmement simple.

5 Comme avec une micropipette conventionnelle, on commence par appliquer l'extrémité inférieure 12 de la micropipette 11 sur un fragment d'un élément biologique, par exemple une cellule que l'on aura préalablement marquée par un traceur émetteur
10 d'un rayonnement lumineux.

Puis, par aspiration buccale au niveau de l'extrémité supérieure 20 de la micropipette 11, on crée une dépression dans la micropipette de manière à amener ce fragment à pénétrer dans l'ouverture que
15 comporte l'extrémité inférieure 12 de la micropipette 11 et à obtenir son scellement sur la paroi 13, comme illustré sur la figure 2 qui montre partiellement un fragment d'une cellule 21 ainsi scellé.

Si ces processus d'invagination et de
20 scellement se déroulent correctement, ils ont pour effet d'amener des molécules du traceur marquant l'élément biologique à venir, tout d'abord à toute proximité, puis au contact de la paroi 13 de la micropipette 11, ce contact étant de plus en plus
25 étroit au fur et à mesure que s'établit le scellement. Ceci se traduit par une augmentation de la proportion des rayons qui pénètrent dans la paroi 13 de la micropipette 11 et qui s'y propagent par réflexion interne jusqu'aux moyens d'extraction 14₁ à 14₄ au
30 niveau desquels ils sont extraits de cette paroi, comme illustré par la figure 2 qui montre le parcours d'un

rayon émis par une molécule 22 de traceur située au contact de la face interne 23 de la paroi 13.

Les rayons extraits de la paroi 13 de la micropipette 11 sont ensuite collectés par les moyens
5 de collecte 16 et transmis par ces derniers aux moyens de mesure 17 qui en mesurent l'intensité.

Ainsi, si les processus d'invagination et de scellement se déroulent correctement, l'intensité lumineuse mesurée par les moyens de mesure 17 augmente
10 au cours de l'aspiration pour devenir optimale à l'obtention du gigaseal.

A l'inverse, une incapacité à obtenir une augmentation soutenue de l'intensité lumineuse mesurée par les moyens de mesure 17 au cours de l'aspiration ou
15 une rupture brutale de cette augmentation signera une mauvaise tenue mécanique du scellement ou une perte de l'intégrité de l'élément biologique ou de sa viabilité s'il s'agit d'un élément vivant (éclatement de l'élément biologique par exemple).

20 La micropipette 11 peut présenter des moyens d'extraction du rayonnement lumineux autres que ceux montrés sur la figure 2. A titre d'exemples, les figures 3 à 6 illustrent cinq variantes de réalisation de ces moyens d'extraction.

25 Dans la variante de réalisation illustrée sur la figure 3, ces moyens d'extraction consistent en une zone annulaire rugueuse 24 située dans la face externe 15 de la paroi 13 de la micropipette 11. A titre d'exemple, les rugosités formant cette zone, qui
30 peuvent être réalisées par un traitement chimique ou mécanique, peuvent présenter une profondeur et une

périodicité (distance entre deux pointes ou entre deux creux) de quelques angströms à quelques dizaines de microns.

5 Dans la variante de réalisation illustrée sur la figure 4, les moyens d'extraction consistent en une bague 34 qui entoure la face externe 15 de la paroi 13 de la micropipette 11 et qui comporte sur sa propre face externe une zone annulaire rugueuse 35 du même type que celle précédemment décrite pour la figure 3.

10 Dans la variante de réalisation illustrée sur la figure 5, les moyens d'extraction consistent en 4 bagues, respectivement 44₁, 44₂, 44₃ et 44₄, de forme et de dimensions identiques les unes aux autres, et qui sont régulièrement réparties sur la face externe 15 de la paroi 13 de la micropipette 11, tandis que, dans la
15 variante de réalisation illustrée sur la figure 6, les moyens d'extraction sont constitués par une seule bague 54 qui entoure la face externe 15 de la paroi 13 de la micropipette 11 et qui comporte une série de trois
20 rainures annulaires 54₁, 54₂ et 54₃ séparées par des nervures.

Les bagues 34, 44₁ à 44₄ et 54 montrées sur les figures 4 à 6 peuvent être solidaires de la paroi 13 de la micropipette 11, auquel cas elles peuvent,
25 soit être d'un seul tenant avec cette paroi, soit être rapportées et fixées sur cette dernière. Elles peuvent également être amovibles, ce qui peut présenter un certain nombre d'avantages comme celui, par exemple, de pouvoir disposer d'un jeu de bagues de configurations
30 différentes et de pouvoir choisir la ou les bagues les plus adaptées aux conditions opératoires retenues.

Par ailleurs, les bagues 34, 44₁ à 44₄ et 54 peuvent être formées du même matériau que celui qui constitue la paroi 13 de la micropipette 11 ou être réalisées en un matériau différent.

5 On se réfère à présent à la figure 7 qui représente schématiquement en perspective un deuxième mode de réalisation d'un dispositif 30 selon l'invention qui est conçu pour permettre le contrôle simultané du scellement de plusieurs éléments
10 biologiques sur des ouvertures d'un support plan par la technique du patch-clamp, ainsi qu'à la figure 8A qui représente schématiquement et partiellement ce dispositif, vu en coupe selon la ligne VIII-VIII.

Comme visible sur la figure 7, le
15 dispositif 30 comprend un support 31 de forme générale quadrangulaire.

Ce support comporte une couche 32 qui est divisée ici en quatre parties, respectivement 32a, 32b, 32c et 32d, de forme et de dimensions identiques les
20 unes aux autres, mais qui pourrait tout aussi bien être divisée en un nombre de parties différent de 4, le dispositif 30 ne représentant qu'un exemple non limitatif d'un dispositif selon l'invention.

Ces quatre parties sont encastrées dans un
25 substrat 33 qui comporte une base 34 et six parois érigées verticalement sur cette base, respectivement 35a, 35b, 35c, 35d, 35e et 35f, délimitant ensemble quatre cavités disposées en damier et logeant chacune l'une des parties 32a à 32d de la couche 32.

30 Chaque partie 32a à 32d de la couche 32 est munie en son centre d'une ouverture traversante,

respectivement 36a, 36b, 36c et 36d, laquelle
communique avec une ouverture qui lui est coaxiale et
qui traverse la base 34 du substrat 33. Le substrat 33
comporte donc également quatre ouvertures traversantes
5 - l'une de ces ouvertures étant visible sur la figure 8
sur laquelle elle est référencée 37a - qui peuvent être
reliées à des capillaires (non représentés sur les
figures 7 et 8A) pouvant être eux-mêmes connectés à un
système d'aspiration de liquides du type micropompe.

10 Les ouvertures traversantes 36a à 36d de la
couche 32 représentant les zones du support 31 sur
lesquelles les éléments biologiques doivent être
positionnés, la couche 32 est constituée d'un matériau
apte à piéger un rayonnement lumineux prévu pour être
15 émis par ces éléments, tandis que le substrat 33 est,
lui, constitué d'un matériau opaque à ce rayonnement.
Ainsi, par exemple, si les éléments biologiques sont
prévus pour être marqués par un traceur fluorescent, la
couche 32 peut être une couche de verre, de silice, de
20 Si_3N_4 , de TiO_2 , d' Al_2O_3 , ou d'un polymère transparent,
tandis que le substrat 33 peut être en un métal (Al,
Au, Cu, Ag, ...), en un semi-conducteur (Si, Ge, ...) ou en
un polymère opaque.

Chaque partie 32a à 32d de la couche 32
25 est, de plus, munie de moyens permettant d'extraire le
rayonnement lumineux piégé dans cette partie en
condition d'utilisation.

Dans la forme de réalisation du dispositif
30 montrée sur les figures 7 et 8A, ces moyens
d'extraction consistent en des anneaux, respectivement
30 38a, 38b, 38c, 38d, qui sont disposés sur la face

supérieure des parties 32a à 32d et qui entourent les ouvertures 36a à 36d. Ces anneaux, qui peuvent être présents de façon provisoire, c'est-à-dire le temps de réaliser l'expérimentation, ou permanente, peuvent être
5 constitués d'un matériau se présentant sous la forme d'un liquide, d'un gel ou d'un solide et qui est déposé sur la face supérieure des parties 32a à 32d avant l'expérimentation ou au cours de celle-ci, ou d'une pièce solidaire desdites parties 32a à 32d, cette pièce
10 pouvant être soit d'un seul tenant avec ces parties, soit être rapportée et fixée sur elles.

Comme visible sur la figure 7, le dispositif 30 comprend aussi des moyens pour collecter le rayonnement lumineux extrait par chacun des anneaux
15 38a à 38d en condition d'utilisation, respectivement 39a, 39b, 39c et 39d, ainsi que des moyens pour mesurer le rayonnement lumineux ainsi collecté, respectivement 40a, 40b, 40c et 40d. Ces moyens de collecte et de mesure peuvent être du même type que ceux précédemment
20 mentionnés en relation avec la figure 2.

L'utilisation du dispositif 30 pour le contrôle simultané du positionnement et/ou du scellement d'éléments biologiques sur les ouvertures 36a à 36d est également extrêmement simple.

25 Après avoir déposé un élément biologique, par exemple une cellule que l'on aura préalablement marquée d'un traceur émetteur d'un rayonnement lumineux sur ou à proximité de chacune des ouvertures 36a à 36d, on crée une dépression dans chaque ouverture du
30 substrat 33, par exemple par aspiration au moyen des capillaires précédemment évoqués, de manière à amener

un fragment des éléments biologiques à pénétrer dans les ouvertures 36a à 36d et à obtenir son scellement sur ces ouvertures, comme illustré sur la figure 8A qui montre une cellule 21 ainsi scellée sur l'ouverture 36a
5 de la couche 32.

Là également, si les processus d'invagination et de scellement s'effectuent correctement, l'intensité lumineuse mesurée par chacun des moyens de mesure 40a à 40d augmente au cours de
10 l'aspiration pour devenir optimale à l'obtention du gigaseal.

Le fait que le dispositif 30 comporte, pour chacune des parties 32a à 32d de la couche 32 et, donc, pour chaque zone de positionnement des éléments
15 biologiques des moyens d'extraction, de collecte et de mesure du rayonnement lumineux piégé indépendants de ceux prévus pour les autres parties, permet d'identifier rapidement et précisément les éléments biologiques correctement scellés et ceux qui ne le sont
20 pas, et, ainsi, de ne poursuivre l'expérimentation que sur ceux dont le scellement apparaît être satisfaisant, d'où un gain considérable à la fois d'efficacité et de temps.

Les figures 8B à 8D sont des
25 représentations schématiques partielles du dispositif montré sur la figure 7, vu en coupe selon la ligne VIII-VIII, qui illustrent trois variantes de réalisation des moyens d'extraction du rayonnement lumineux.

30 Dans la variante illustrée sur la figure 8B, les moyens d'extraction consistent en une série de

quatre rainures, respectivement 48a₁, 48a₂, 48a₃ et 48a₄, séparées par trois nervures, qui sont de forme et de dimensions identiques les unes aux autres et qui sont ménagées dans la face supérieure de la partie 32a de la couche 32, tout autour de l'ouverture 36a. A titre d'exemple, ces rainures et nervures peuvent présenter une périodicité de quelques centaines de nanomètres à quelques microns.

Dans la variante illustrée sur la figure 8C, les moyens d'extraction consistent en une zone rugueuse 58 ménagée dans la face supérieure de la partie 32a de la couche 32, tout autour de l'ouverture 36a. A titre d'exemple, les rugosités formant cette zone, qui peuvent être réalisées par traitement chimique ou mécanique, peuvent présenter une profondeur et une périodicité de quelques angströms à quelques dizaines de microns.

Enfin, dans la variante illustrée sur la figure 8D, les moyens d'extraction sont constitués par les faces latérales des parois 35a et 35f du substrat 33 dont l'inclinaison conjuguée à l'opacité de ces parois sont de nature à diriger le rayonnement lumineux piégé dans la partie 32a de la couche 32 vers les moyens de collecte 39a (visibles sur la figure 8A mais non représentés sur la figure 8D).

REFERENCES CITEES

- [1] WO 01/25769
[2] WO 01/59447

- [3] M. Lieberherr et al., *Surface Science*, vol. 189/190, 954-959, 1987
- [4] B. Dubertret, *M/S n°5*, vol. 19, 532-534, 2003.

REVENDICATIONS

1. Procédé de contrôle du positionnement d'un élément biologique sur une zone d'un support, dans lequel, cet élément biologique étant marqué par un traceur émetteur d'un rayonnement lumineux et la zone du support sur laquelle il doit être positionné étant située dans une couche d'un matériau apte à piéger ce rayonnement lumineux :
- 5
- 10 a) on permet à l'élément biologique de se positionner sur la zone du support ;
- b) on mesure l'intensité du rayonnement lumineux piégé dans ladite couche ; et
- c) on détermine le positionnement de l'élément biologique en comparant la valeur d'intensité ainsi mesurée à au moins une valeur de référence ;
- 15 les étapes a), b) et c) pouvant être réalisées successivement ou simultanément.
- 20 2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'élément biologique est marqué par un traceur fluorescent.
3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel le traceur fluorescent est un fluorophore organique couplé chimiquement à une ou plusieurs protéines membranaires de l'élément biologique, un anticorps marqué par un fluorophore organique, qui est dirigé contre une protéine membranaire de l'élément biologique et qui est fixé sur cet élément par une
- 25
- 30 réaction antigène-anticorps, ou une protéine

membranaire fluorescente qui est exprimée par l'élément biologique.

4. Procédé selon l'une quelconque des
5 revendications précédentes, dans lequel la couche de
matériau apte à piéger le rayonnement lumineux est en
un verre organique ou minéral, en silice, en nitrure de
silicium, en dioxyde de titane, en dioxyde de hafnium,
en alumine, en silice chargée en ions potassium ou
10 argent, ou en un polymère de synthèse.

5. Procédé selon l'une quelconque des
revendications précédentes, qui comprend, préalablement
à l'étape a) ou entre les étapes a) et b), une étape
15 consistant à munir le support de moyens pour extraire
le rayonnement lumineux piégé dans la couche de
matériau apte à piéger le rayonnement lumineux.

6. Procédé selon la revendication 5, qui
20 comprend, préalablement à l'étape a) ou entre les
étapes a) et b), une étape consistant à placer, en
regard de la couche de matériau apte à piéger un
rayonnement lumineux, des moyens pour collecter le
rayonnement lumineux extrait de cette couche.

25

7. Procédé selon l'une quelconque des
revendications précédentes, dans lequel le
positionnement de l'élément biologique sur la zone du
support comprend le scellement de cet élément sur cette
30 zone.

8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel, la zone du support sur laquelle l'élément biologique doit être scellé étant constituée par les bords d'une ouverture traversante ménagée dans ce support, l'étape a) comprend la création d'une dépression dans cette ouverture.

9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel les étapes a), b) et c) sont réalisées simultanément.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'élément biologique est une cellule.

11. Dispositif (10, 30) de contrôle du positionnement d'au moins un élément biologique sur au moins une zone d'un support, comprenant :

- un support (11, 31) comprenant une couche (13, 32) d'un matériau apte à piéger un rayonnement lumineux prévu pour être émis par ledit élément biologique, et des moyens pour extraire le rayonnement lumineux piégé dans cette couche, ladite zone (12, 36a-36d) du support étant située dans ladite couche ; et

- des moyens (17, 40a-40d) pour mesurer l'intensité du rayonnement lumineux extrait de ladite couche.

12. Dispositif (10) selon la revendication 11, dans lequel le support est un tube ouvert à ses

deux extrémités et la zone (12) sur laquelle l'élément biologique doit être positionné est l'une des deux ouvertures de ce tube.

5 13. Dispositif (10) selon la revendication 12, dans lequel le support est une micropipette (11), notamment une micropipette adaptée à la mise en œuvre de la technique du patch-clamp.

10 14. Dispositif (30) selon la revendication 11, dans lequel le support est un support plan (31) et ladite zone sur laquelle l'élément biologique doit être positionné est une ouverture que comporte ce support.

15 15. Dispositif selon la revendication 14, dans lequel l'ouverture est une ouverture traversante (36a-36d).

 16. Dispositif selon la revendication 15,
20 dans lequel le support est un support plan (31) adapté à la mise en œuvre de la technique du patch-clamp.

 17. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 16, dans lequel la couche (13, 32)
25 de matériau apte à piéger le rayonnement lumineux est en un verre organique ou minéral, en silice, en nitrure de silicium, en dioxyde de titane, en dioxyde de hafnium, en alumine, en silice chargée en ions potassium ou argent, ou en un polymère de synthèse.

18. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 17, dans lequel la couche (13, 32) de matériau apte à piéger le rayonnement lumineux présente une épaisseur d'au moins 200 nm.

5

19. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 18, dans lequel les moyens d'extraction du rayonnement lumineux consistent en un relief ou un creux ou en une série de reliefs et de creux (14₁-14₄, 24, 48a₁-48a₄, 58) ménagés dans l'une des faces de la couche de matériau apte à piéger le rayonnement lumineux.

20. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 18, dans lequel les moyens d'extraction du rayonnement lumineux consistent en une pièce (34, 44₁-44₄, 54, 38a-38d) qui est disposée sur l'une des faces de la couche apte à piéger le rayonnement lumineux, et qui forme sur cette face un relief ou une série de reliefs et de creux.

21. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 18, dans lequel les moyens d'extraction du rayonnement lumineux consistent en un matériau (38a-38d) qui est déposé sur l'une des faces de la couche apte à piéger le rayonnement lumineux, en un ou plusieurs points de cette face.

22. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 18, dans lequel les moyens d'extraction du rayonnement lumineux consistent en une

30

interruption de la couche apte à piéger le rayonnement lumineux par un matériau opaque au rayonnement lumineux.

5 23. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, dans lequel, le support étant un support plan, les moyens d'extraction du rayonnement lumineux s'étendent tout autour de la zone de ce support sur laquelle l'élément biologique doit être
10 positionné.

 24. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 23, qui comprend de plus des moyens (16, 39a-39d) pour collecter le rayonnement lumineux
15 extrait de la couche apte à piéger le rayonnement lumineux.

 25. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 et 14 à 24, dans lequel, le support
20 étant un support plan (31) comprenant une pluralité de zones pour le positionnement d'une pluralité d'éléments biologiques :

 - la couche (32) de matériau apte à piéger le rayonnement lumineux est divisée en autant de
25 parties (32a-32d) que le support comprend de zones ;

 - chaque zone (36a-36d) du support est située dans l'une de ces parties ;

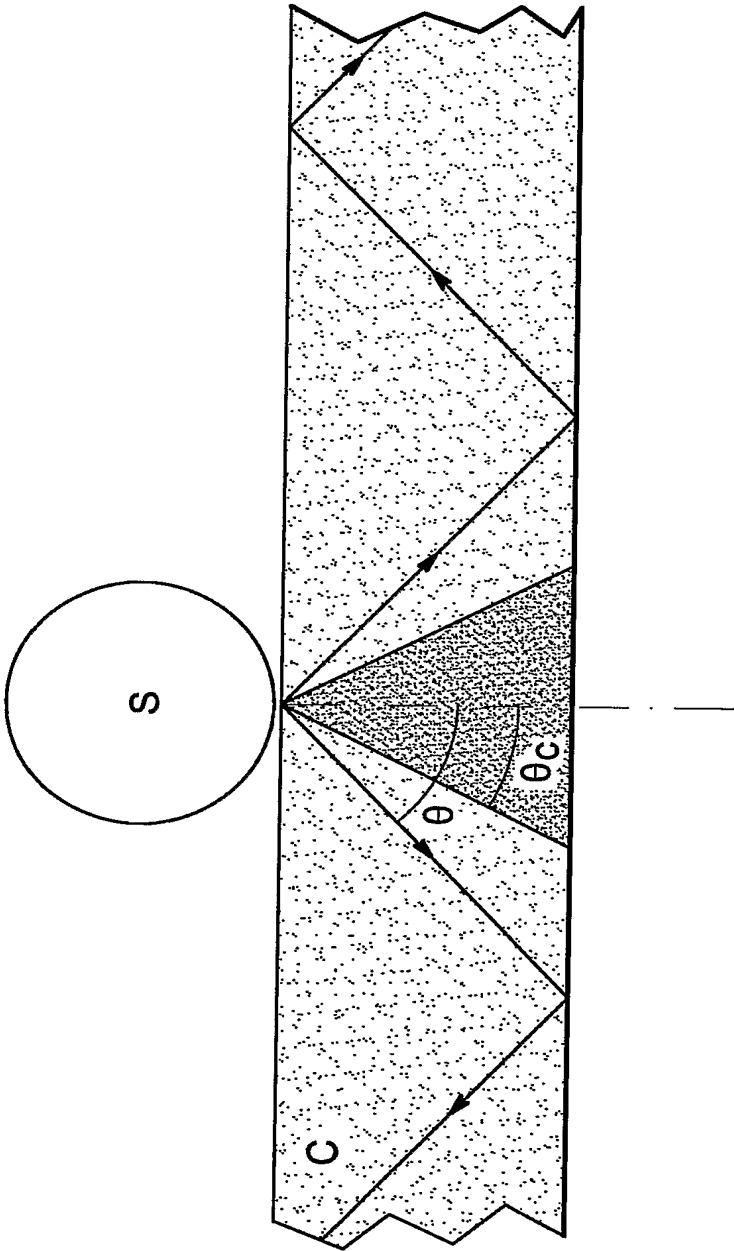
 - ces parties sont séparées les unes des autres par des moyens (35e-35f) propres à empêcher le
30 rayonnement lumineux de se propager d'une partie à l'autre ; et

– pour chaque partie de ladite couche, le support comprend des moyens (38a-38d) pour extraire le rayonnement lumineux piégé dans cette partie, tandis que le dispositif comprend des moyens (39a-39d) pour collecter le rayonnement lumineux extrait de cette partie et des moyens (40a-40d) pour mesurer l'intensité du rayonnement lumineux collecté par lesdits moyens de collecte.

26. Dispositif selon la revendication 25, dans lequel la couche (32) apte à piéger le rayonnement lumineux est supportée par une couche (34) d'un matériau opaque à ce rayonnement lumineux et les parties de la couche apte à piéger le rayonnement lumineux sont séparées par des saillies (35a-35f) de la couche opaque au rayonnement lumineux s'étendant dans l'épaisseur de la couche apte à piéger le rayonnement lumineux.

27. Application d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 26 au contrôle de l'établissement d'un scellement de haute résistance entre au moins un élément biologique et au moins une zone d'un support par la technique du patch-clamp.

FIG. 1



2 / 5

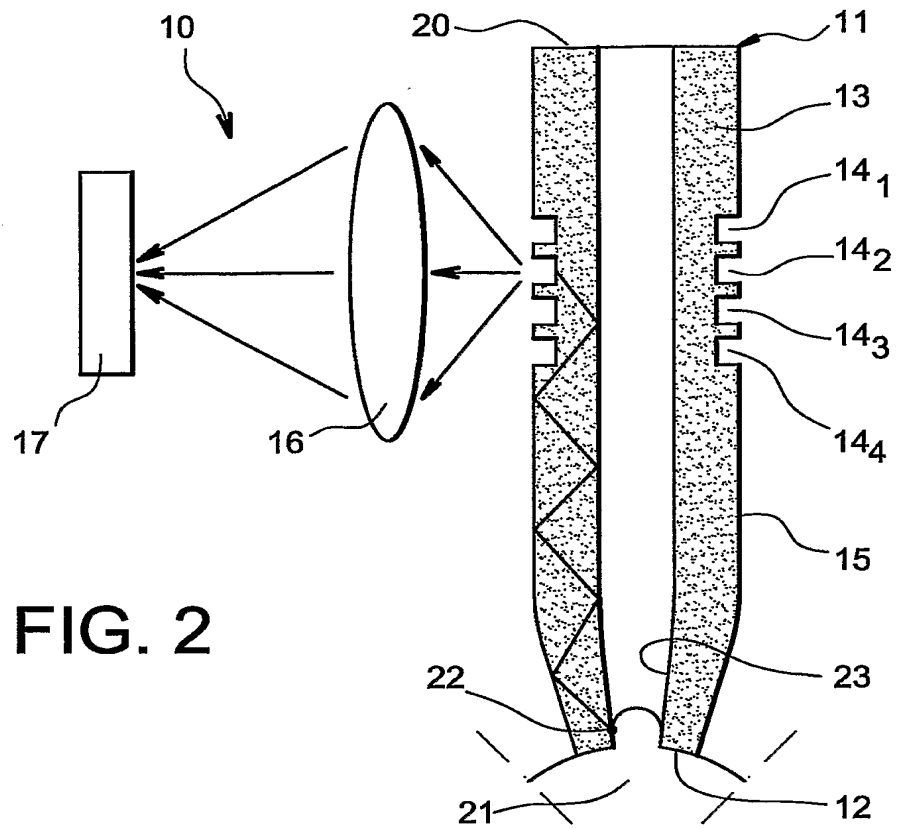


FIG. 2

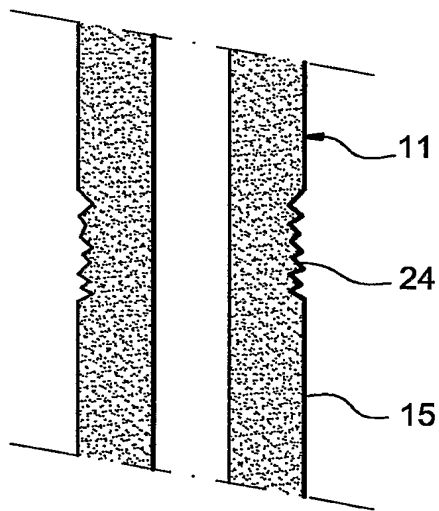


FIG. 3

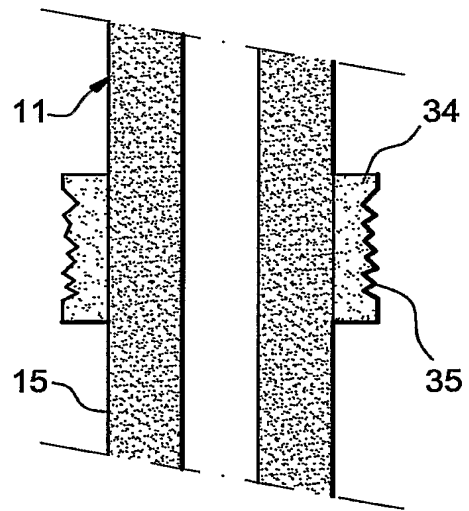


FIG. 4

3 / 5

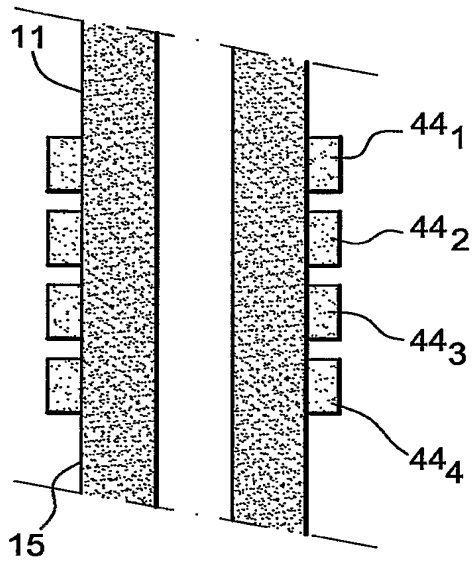


FIG. 5

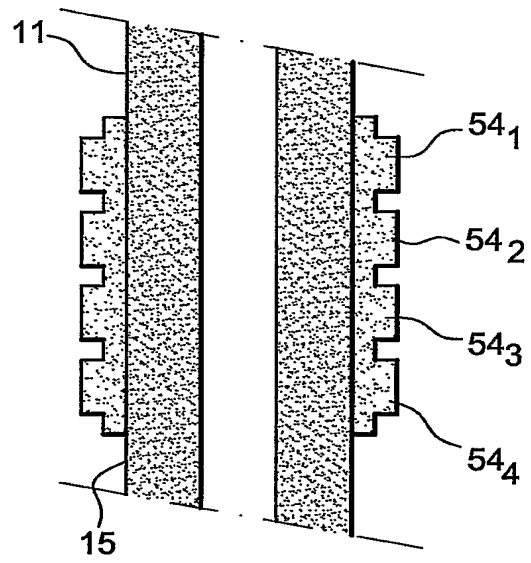


FIG. 6

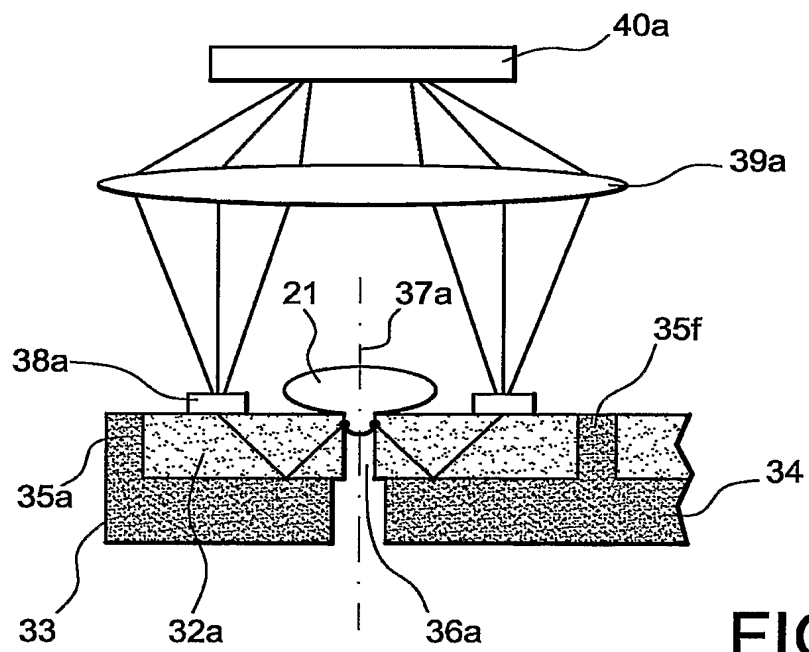


FIG. 8A

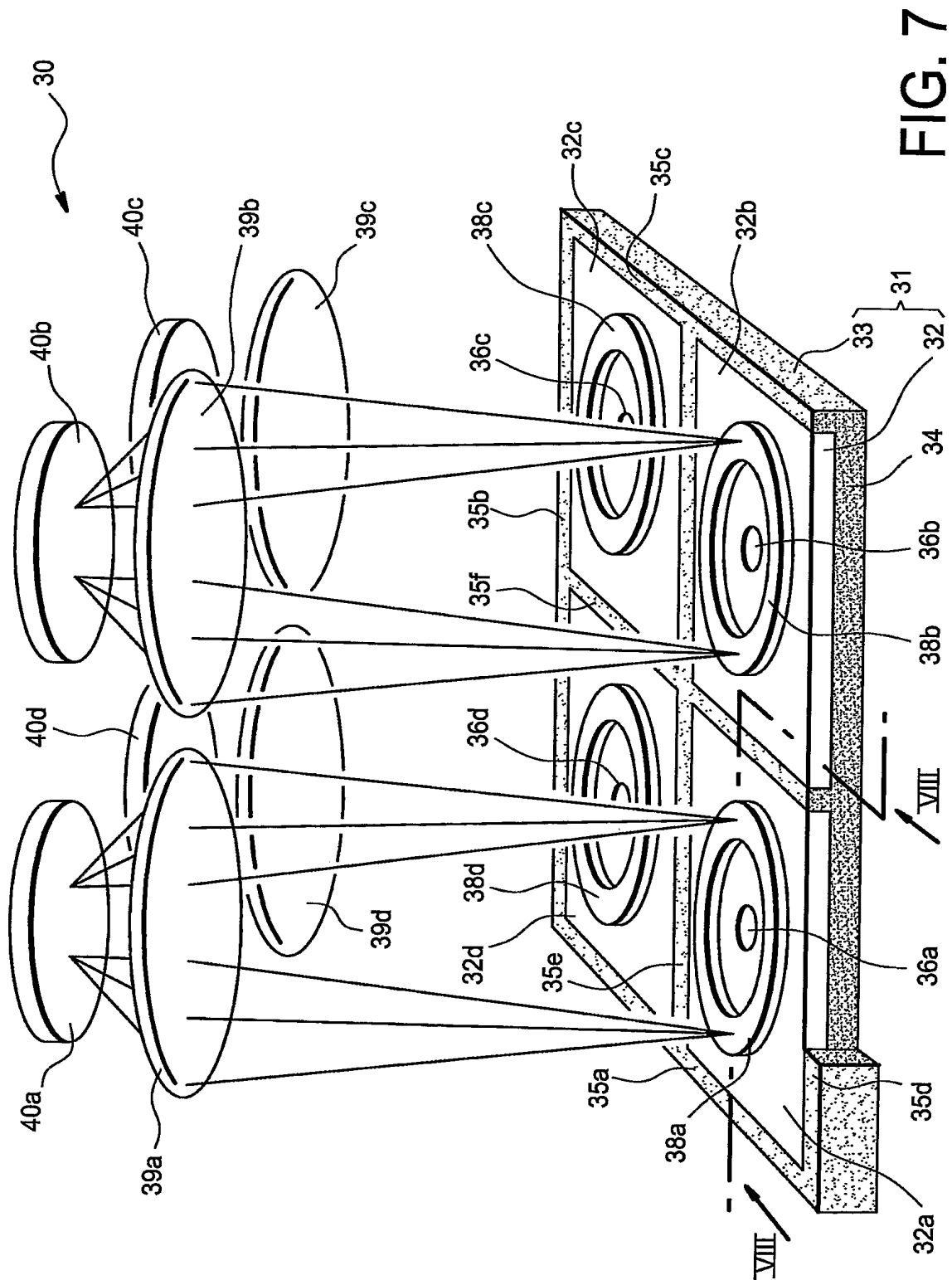


FIG. 7

5 / 5

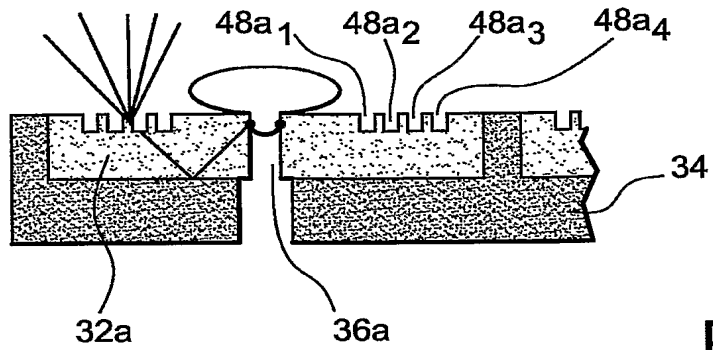


FIG. 8B

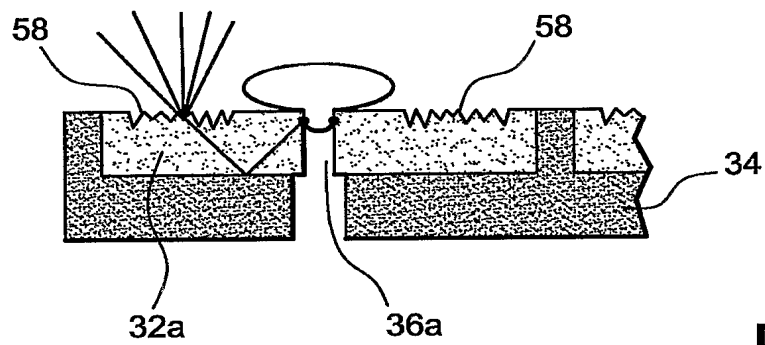


FIG. 8C

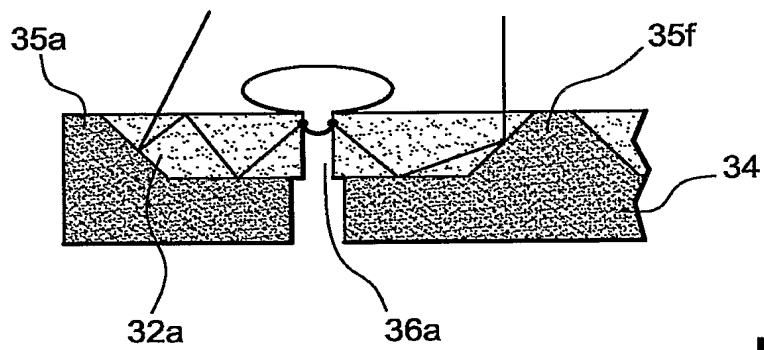


FIG. 8D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/050118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/487 C12M1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/10747 A (FLYION GMBH ; LEPPLE WIENHUES ALBRECHT (DE)) 7 February 2002 (2002-02-07) page 13, line 4 - line 23; figure 5	1,11
A	WO 00/34776 A (BYRNE NICHOLAS GERARD ; CENES LTD (GB); OWEN DAVID GERAINT (GB)) 15 June 2000 (2000-06-15) page 29, line 13 - page 30, line 5; figure 12	1,11
A	EP 1 067 378 A (KARUBE ISAO ; SAITOH TAKASHI (JP)) 10 January 2001 (2001-01-10) example 3	1,11
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 June 2005

Date of mailing of the international search report

08/07/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Komenda, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/050118

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PICOLLET-D'HAHAN N ET AL: "Multi-patch : a chip-based ion-channel assay system for drug screening" PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEMS, NANO AND SMART SYSTEMS, 20 July 2003 (2003-07-20), pages 251-254, XP010650478 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR2005/050118

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0210747	A	07-02-2002	EP 1178315 A1	06-02-2002
			AU 8204801 A	13-02-2002
			CA 2417796 A1	07-02-2002
			CN 1466681 A	07-01-2004
			WO 0210747 A2	07-02-2002
			EP 1283985 A2	19-02-2003
			JP 2004518109 T	17-06-2004
			US 2003022268 A1	30-01-2003
WO 0034776	A	15-06-2000	AU 775985 B2	19-08-2004
			AU 1575400 A	26-06-2000
			CA 2352877 A1	15-06-2000
			EP 1141704 A1	10-10-2001
			WO 0034776 A1	15-06-2000
			HU 0104675 A2	29-04-2002
			JP 2002532684 T	02-10-2002
			MX PA01005582 A	02-07-2002
			NO 20012766 A	06-08-2001
			PL 348035 A1	06-05-2002
			ZA 200103985 A	22-11-2001
EP 1067378	A	10-01-2001	AU 3277299 A	27-09-1999
			EP 1067378 A1	10-01-2001
			US 6537800 B1	25-03-2003
			WO 9946588 A1	16-09-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2005/050118

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/487 C12M1/34

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N C12M

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 02/10747 A (FLYION GMBH ; LEPPLE WIENHUES ALBRECHT (DE)) 7 février 2002 (2002-02-07) page 13, ligne 4 - ligne 23; figure 5	1, 11
A	WO 00/34776 A (BYRNE NICHOLAS GERARD ; CENES LTD (GB); OWEN DAVID GERAINT (GB)) 15 juin 2000 (2000-06-15) page 29, ligne 13 - page 30, ligne 5; figure 12	1, 11
A	EP 1 067 378 A (KARUBE ISAO ; SAITOH TAKASHI (JP)) 10 janvier 2001 (2001-01-10) exemple 3	1, 11
	----- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 juin 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08/07/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Komenda, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2005/050118

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>PICOLLET-D'HAHAN N ET AL: "Multi-patch : a chip-based ion-channel assay system for drug screening" PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEMS, NANO AND SMART SYSTEMS, 20 juillet 2003 (2003-07-20), pages 251-254, XP010650478 le document en entier -----</p>	1,11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Donnée Internationale No

PCT/FR2005/050118

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0210747	A	07-02-2002	EP 1178315 A1	06-02-2002
			AU 8204801 A	13-02-2002
			CA 2417796 A1	07-02-2002
			CN 1466681 A	07-01-2004
			WO 0210747 A2	07-02-2002
			EP 1283985 A2	19-02-2003
			JP 2004518109 T	17-06-2004
			US 2003022268 A1	30-01-2003
WO 0034776	A	15-06-2000	AU 775985 B2	19-08-2004
			AU 1575400 A	26-06-2000
			CA 2352877 A1	15-06-2000
			EP 1141704 A1	10-10-2001
			WO 0034776 A1	15-06-2000
			HU 0104675 A2	29-04-2002
			JP 2002532684 T	02-10-2002
			MX PA01005582 A	02-07-2002
			NO 20012766 A	06-08-2001
			PL 348035 A1	06-05-2002
			ZA 200103985 A	22-11-2001
EP 1067378	A	10-01-2001	AU 3277299 A	27-09-1999
			EP 1067378 A1	10-01-2001
			US 6537800 B1	25-03-2003
			WO 9946588 A1	16-09-1999